

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift  
⑯ DE 3317415 A1

⑯ Int. Cl. 3:

C12N 13/00

C12 N 15/00

C12 M 1/00

⑯ Aktenzeichen: P 33 17 415.6  
⑯ Anmeldetag: 13. 5. 83  
⑯ Offenlegungstag: 15. 11. 84

Corresp to US 4764473

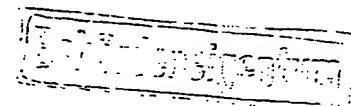
DE 3317415 A1

⑯ Anmelder:

Kernforschungsanlage Jülich GmbH, 5170 Jülich, DE

⑯ Erfinder:

Matschke, Christian, 5110 Alsdorf, DE; Arnold, William Michael, 5100 Aachen, DE; Büchner, Karl-Heinz, 5170 Jülich, DE; Zimmermann, Ulrich, Prof., 8700 Würzburg, DE



Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Kammer zur Behandlung von Zellen im elektrischen Feld

Die Erfindung bezieht sich auf eine Kammer für die Behandlung von Zellen im elektrischen Feld, bei der ein aus elektrisch nichtleitenden Wänden gebildeter Raum zur Aufnahme der die Zellen enthaltenden Suspension vorgesehen ist. In den Raum ragen wenigstens zwei Elektroden derart hinein, daß ein zwischen den Elektroden liegender Bereich gebildet wird, in welchem die Zellen einem zwischen den Elektroden ausgebildeten elektrischen Feld ausgesetzt sind. Erfindungsgemäß ist der zur Aufnahme der die Zellen enthaltenden Suspension vorgesehene Raum von einem Innenkörper und einer den Innenkörper um dessen Längsachse mit gleichbleibendem Abstand umschließenden Außenhülle seitlich begrenzt. In den so gebildeten Raum ragen Elektroden hinein, die den Innenkörper in Form einer mehrgängigen Schraube mit gleichbleibender Steigung derart umgeben, daß der durch die Elektroden begrenzte Bereich als ein in Form einer mehrgängigen Schraube den Innenkörper umgebende Teilbereich des Raumes ausgebildet ist. In einer besonderen Ausführungsform ist die Kammer in der Art eines Reagenzglases mit Innenkörper ausgebildet, an dessen unterem Ende ein Zusatzgefäß zur Aufnahme der elektrisch behandelten Zellen vorgesehen ist.

DE 3317415 A1

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Kammer für die Behandlung von Zellen im elektrischen Feld, bei der ein aus elektrisch nicht leitenden Wänden gebildeter Raum zur Aufnahme der die Zellen enthaltenden Suspension vorgesehen ist,  
5 in den wenigstens zwei Elektroden derart hineinragen, daß ein zwischen den Elektroden liegender, durch diese begrenzter Bereich gebildet wird, in welchem die Zellen einem zwischen den Elektroden ausgebildeten elektrischen Feld ausgesetzt  
10 sind, dadurch gekennzeichnet, daß der Raum (1) von einem Innenkörper (2) und einer den Innenkörper um dessen Längsachse mit gleichbleibendem Abstand umschließenden Außenhülle (3) seitlich begrenzt ist und daß  
15 die in den Raum hineinragenden Elektroden (4 und 5) den Innenkörper in Form einer mehrgängigen Schraube mit gleichbleibender Steigung derart umgeben, daß der durch die Elektroden begrenzte Bereich als ein in Form einer mehrgängigen Schraube  
20 den Innenkörper um dessen Längsachse umgebender Teilbereich (6a, 6b) des Raumes (1) ausgebildet ist.
2. Kammer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß jede Elektrode (4 und 5) nach beiden Seiten zur nächstliegenden anderen Elektrode den gleichen Abstand hat.  
R 1.676
3. Kammer nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Innenkör-

- 2 -

per (2) zylinderförmig und die Außenhülle (3) als zylinderförmiger Mantel mit gemeinsamer Mittelachse ausgebildet sind.

- 5 4. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (4, 5) an dem Innenkörper (2) anliegen.
- 10 5. Kammer nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrodenanschlüsse (4a, 4b, 5a, 5b) durch den Innenkörper (2) nach außen geführt sind.
- 15 6. Kammer nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (4, 5) an der Innenwand der Außenhülle (3) anliegen.
- 20 7. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Abstand zwischen den Elektroden (4, 5) und der den Elektroden gegenüberliegenden Wandung so bemessen ist, daß die suspendierten Zellen und, im Falle einer Fusion von Zellen, die Fusionsprodukte den Durchgang zwischen Elektroden (4, 5) und der Wandung gerade ohne Schädigung passieren können.
- 25 8. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Abstand zwischen den Elektroden (4 und 5) je nach der Art und Größe der zu behandelnden Zellen 20 µm bis 500 µm beträgt.

- 3 -

- 3 -

9. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (4, 5) bei größerem Elektrodenabstand einen kreisförmigen Querschnitt aufweisen.

5

10. Kammer nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (4, 5) zu etwa einem Drittel ihres Durchmessers in ihrer Auflage versenkt angeordnet sind.

10

11. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß bei einer Elektrodenlänge von mehr als 1 m die Elektroden (4, 5) jeweils als elektrische Schleife ausgebildet und jedes Ende der Elektroden (4, 5) mit einem Elektrodenanschluß (4a, 4b, 5a, 5b) in Verbindung steht.

15

20

12. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Außenhülle (3) aus durchsichtigem Material besteht und an wenigstens einer Stelle ihres Außenmantels eben ausgebildet ist.

25

13. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß durch den Innenkörper (2) eine Kühlleitung (14) geführt ist.

30

14. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Innenkörper (2) ein zum Raum (1) der

- 4 -

- 4 -

Kammer hin geöffnetes, von außen über eine Leitung zugängliches Porensystem aufweist, über welches eine Flüssigkeit in den Raum (1) gedrückt werden kann, wobei die dem Raum zugewendeten Öffnungen 5 der Poren kleiner sind als der Durchmesser der zu behandelnden Zellen.

15. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, 10 daß die Außenhülle (3) an einer Stirnseite geschlossen ausgeführt ist, der Innenkörper (2) stabförmig und an die innere Form der Außenhülle (3) angepaßt ausgebildet ist und daß ein Verschluß (10) zum Verschließen des Raumes (1) an der 15 offenen Stirnseite der Außenhülle (3) vorgesehen ist.
16. Kammer nach Anspruch 15, daß durch gekennzeichnet, 20 daß die geschlossene Stirnseite der Außenhülle (3) eine Öffnung (9) aufweist.
17. Kammer nach Anspruch 16, daß durch gekennzeichnet, 25 daß die Öffnung (9) verschließbar ist.
18. Kammer nach einem der Ansprüche 16 und 17, daß durch gekennzeichnet, 30 daß ein an die Außenhülle (3) lösbar anschließbares, mit der Öffnung (9) in der Außenhülle in Verbindung stehendes Zusatzgefäß (11) vorgesehen ist.

- 5 -

- 5 -

19. Kammer nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die über die Öffnung (9) in der Stirnseite der Außenhülle (3) führende Verbindung zwischen dem Raum (1) der Kammer und dem Innenraum des Zusatzgefäßes (11) unterbrechbar ist.  
5
20. Kammer nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß zur Unterbrechung der über die Öffnung (9) führenden Verbindung zwischen dem Raum (1) der Kammer und dem Innenraum des Zusatzgefäßes (11) die Öffnung des Zusatzgefäßes mit einer Folie (12) abgedeckt ist.  
10
21. Kammer nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß eine von außerhalb der Kammer betätigbare Einrichtung (13) vorgeschen ist, mittels der die Folie (12) bei an der Außenhülle (3) befestigtem Zusatzgefäß (11) durchlöchert werden kann.  
15  
20

10.05.83

3317415

Kernforschungsanlage Jülich  
Gesellschaft mit beschränkter Haftung

-6-

Kammer zur Behandlung von Zellen im elektrischen  
Feld

---

Die Erfindung bezieht sich auf eine Kammer für  
die Behandlung von Zellen im elektrischen Feld,  
bei der ein aus elektrisch nichtleitenden Wänden  
gebildeter Raum zur Aufnahme der die Zellen

5       enthaltenden Suspension vorgesehen ist, in den  
wenigstens zwei Elektroden derart hineinragen,  
daß ein zwischen den Elektroden liegender, durch  
diese begrenzter Bereich gebildet wird, in welchem  
die Zellen einem zwischen den Elektroden ausge-  
10      bildeten elektrischen Feld ausgesetzt sind.

Aus der DE-PS 24 05 119 ist ein Verfahren zur  
Behandlung von Zellen im elektrischen Feld bekannt,  
bei dem die Membran von Zellen durch Anwendung  
15      eines elektrischen Feldes, dessen Stärke  $10^3$   
bis  $10^5$  V/cm beträgt, durchbrochen wird. Die  
dabei bewirkte Permeabilitätserhöhung der Zell-  
membran macht es möglich, Stoffe durch die Membran  
auszutauschen, ohne daß die Zellen in ihrer  
20      Lebensfähigkeit beeinträchtigt sind. Denn die  
Erhöhung der Permeabilität ist nach dem Austausch  
der Stoffe in einem einfachen Verfahrensschritt  
reversibel. Auf diese Weise ist es beispielsweise  
auch möglich, Gene oder Enzyme in die Zellen  
25      einzulagern.

1.676

ba/ha

- 2 -

Das aus der vorgenannten Patentschrift bekannte Verfahren der Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran ist auch zur Fusion von Zellen einsetzbar.

5

Zwei Zellen in einer Suspension sollten, wenn sie sich berühren und ein enger Kontakt zwischen den Membranen beider Zellen entsteht, miteinander verschmelzen, da die Bausteine in der

10

Membran beweglich sind. Eine derartige spontane Verschmelzung (Fusion) von Zellen wird unter natürlichen Bedingungen jedoch nicht oder nur äußerst selten beobachtet. Eine bekannte Aus-

15

nahme stellt die Befruchtung einer Eizelle durch eine Samenzelle bei der sexuellen Fortpflanzung dar. Die spontane Fusion wird durch die negative Ladung der Phospholipide und anderer Membrankomponenten behindert. Sie führt

20

zur Abstoßung der Zellen, wenn sie sich auf einen geringen Abstand genähert haben. Zellverschmelzung erfordert aber, daß die beiden Membranen sich bis auf einen Abstand von weniger

als  $10^{-7}$  cm nähern können.

25

Die mit technischen Mitteln, also auf künstlichem Wege durchgeführte Fusion von Zellen ist in einem weiten Anwendungsbereich einsetzbar.

So ist es für die biologisch-medizinische Forschung von großem Interesse, eine große Zahl

30

von Zellen miteinander zu verschmelzen. Bei

geeigneter Größe der durch Fusion mehrerer

oder gegebenenfalls vieler Zellen - beispielsweise

1000 bis 10000 Blutkörperchen -

entstandenen großen Zellen lassen sich dann  
Mikroelektroden, Mikrodruckmeßsonden und andere  
Sensoren ohne irreversible Zerstörung der Membran  
in die große Zelle einführen. Die Technik, über  
5 die Sensoren direkt eine Reihe von Zellen und  
Membranfunktionen zu erfassen, ist dabei für  
die klinische Diagnostik, z.B. bei der Früher-  
kennung von Erkrankungen sowie generell für  
die Grundlagenforschung von Bedeutung.

10

Die Technik der Fusion von Zellen kann außerdem  
eingesetzt werden für die Bildung von Hybridzellen  
durch Verschmelzung von zwei Zellen unterschiedlicher  
Herkunft, die evolutionsmäßig nicht zu weit

15

voneinander entfernt stehen sollen. Dabei können  
Zellhybride aus Pflanzenzellen, aus denen wieder  
ganze Pflanzen gezüchtet werden können oder  
Zellhybride aus tierischen Zellen, über die  
monoklonale Antikörper, z.B. gegen Tumore und

20

Leukämie, gewonnen werden können, gebildet werden.  
Als Beispiel sei genannt die Verschmelzung einer  
Lymphozytenzelle mit einer Myelomzelle, die  
besonders aus medizinischer und pharmazeutischer  
Sicht von großem Interesse ist. Bestimmte Lympho-

25

zyten bilden gegen Fremdstoffe im Organismus  
Antikörper, z.B. gegen ein Fremdeiweiß, das  
in die Blutbahn injiziert worden ist. Isoliert  
man die Lymphozyten und fusioniert sie mit einer  
Tumorzelle, wie der Myelomzelle, so besteht

30

die Chance, daß sich eine sogenannte Hybridomzelle

bildet, die die Eigenschaft beider Elternzellen besitzt. Diese Zelle produziert Antikörper, und zwar spezifisch nur gegen den betreffenden Fremdstoff (sogenannte monoklonale Antikörper).

5 Sie ist unsterblich und lässt sich im Gegensatz zu einer normalen ausdifferenzierten Zelle, wie dem Lymphozyten, permanent in Nährmedien vermehren.

10 Ein Verfahren zur Fusion von Zellen der eingangs bezeichneten Art ist aus Biochimica et Biophysica Acta, 694 (1982), 227 - 277 (Electric Field-Mediated Fusion And Related Electrical Phenomena, U. Zimmermann) bekannt. Bei diesem bekannten Verfahren - dessen Ablauf unter dem Mikroskop beobachtet werden kann - wird der Membrankontakt zwischen wenigstens zwei Zellen durch Anlegen eines alternierenden, schwach homogenen Feldes erzeugt. Durch das elektrische Feld werden, bedingt durch 15 Polarisationsprozesse in der Zelle, Dipole erzeugt, die sich gegenseitig anziehen, wenn sich die Zellen während ihrer Wanderung im elektrischen Feld einander nähern (sogenannte Dielectrophorese). Nach der Bildung der Zellenreihe werden die 20 Störungen in der Membranstruktur zwischen benachbarten Zellen durch einen elektrischen Durchbruchpuls ausgelöst (J. Membrane Biol. 67, 165 - 182 (1982), Electric Field-Induced Cell-to-Cell Fusion, U. Zimmermann and J. Vienken).

25 Dabei werden - nach den bisherigen Modellvor-

stellungen - Löcher in der Membrankontaktzone benachbarter Zellen erzeugt, die zu einem zytoplasmatischen Kontinuum zwischen den beiden Zellen und zur Brückenbildung von Lipiden zwischen den Membranen der benachbarten Zellen führen.

5 Die Lipidmoleküle ordnen sich nicht mehr in ihre ursprüngliche Membran ein. Sobald sich eine Brücke gebildet hat, kommt es aus energetischen Gründen zur Abrundung des entstandenen Gebildes, 10 das aus den über die Lipidbrücken miteinander verbundenen Zellen besteht.

Zur Durchführung dieser bekannten Verfahren wird eine Kammer der eingangs bezeichneten Art eingesetzt. Die Elektroden der Kammer sind dabei 15 zur Bildung der Zellenreihe an eine Einrichtung zur Erzeugung eines alternierenden elektrischen Feldes und zur Erzeugung des elektrischen Durchbruches an eine Einrichtung zur Erzeugung elektrischer Spannungspulse angeschlossen. 20

Bei der Durchführung der bekannten Verfahren ist man bestrebt, zur Erhöhung der Effektivität der Verfahren die in einer Suspension vorliegenden 25 Zellen möglichst alle der elektrischen Behandlung zu unterwerfen. Dies setzt voraus, daß die in die Kammer eingegebenen Zellen möglichst alle dem elektrischen Feld ausgesetzt werden. Die toten Zonen in der Kammer sollten daher möglichst 30 klein sein.

AA  
- 6 -

Es ist Aufgabe der Erfindung, eine Kammer der eingangs bezeichneten Art zu schaffen, bei der ein hoher Anteil der in die Kammer eingegebenen Zellen dem elektrischen Feld ausgesetzt wird.

5 Die Kammer soll außerdem die gleichzeitige und gleichmäßige Behandlung einer großen Anzahl von Zellen ermöglichen.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird 10 gemäß der Erfindung dadurch gelöst, daß der Raum zur Aufnahme der die Zellen enthaltenden Suspension von einem Innenkörper und einer den Innenkörper um dessen Längsachse mit gleichbleibendem Abstand umschließenden Außenhülle seitlich begrenzt 15 ist und daß die in den Raum hineinragenden Elektroden den Innenkörper in Form einer mehrgängigen Schraube mit gleichbleibender Steigung derart umgeben, daß der durch die Elektroden begrenzte Bereich als ein in Form einer mehrgängigen Schraube 20 den Innenkörper um dessen Längsachse umgebender Teilbereich des Raumes ausgebildet ist.

Die Elektroden und der begrenzte Bereich sind 25 beispielsweise in der Form einer Doppelhelix, einer Vierfach-Helix usw. ausgebildet.

Eine sehr vorteilhafte Ausführungsform der Kammer besteht darin, daß jede Elektrode nach beiden Seiten zur nächstliegenden anderen Elektrode 30 den gleichen Abstand hat. Damit wird erreicht, daß der Feldverlauf zwischen zwei benachbarten Elektroden gleich ist, womit die effektive Länge der Elektroden praktisch verdoppelt ist.

Der längliche Innenkörper ist zweckmäßigerweise zylinderförmig und die Außenhülle als zylinderförmiger Mantel mit gemeinsamer Mittelachse ausgebildet. Der längliche Innenkörper kann jedoch auch abweichend von der idealen Kreisform beispielsweise einen ovalen oder auch quadratischen Querschnitt aufweisen, an den jeweils die innere Form der Außenhülle angepaßt ist.

5

10 Eine zweckmäßige Ausführungsform der Kammer gemäß der Erfindung besteht darin, daß die Elektroden an dem Innenkörper anliegen. Dabei ist es ferner zweckmäßig, die Elektrodenanschlüsse durch den Innenkörper nach außen zu führen.

15 Bei einer weiteren Ausführungsform der Kammer liegen die Elektroden an der Innenwand der Außenhülle an.

20 Bei allen Ausführungsformen der Kammer gemäß der Erfindung ist die innere Form der Außenhülle in einem möglichst geringen Abstand von 20  $\mu\text{m}$  bis 500  $\mu\text{m}$  - im allgemeinen jedoch nicht geringer als 100  $\mu\text{m}$  - an die Form des Innenkörpers angepaßt,

25 so daß das tote Volumen, also das Volumen, in welchem Zellen nicht dem elektrischen Feld ausgesetzt sind, möglichst klein ist. Dabei ist es zweckmäßig, daß der Abstand zwischen den Elektroden und den Elektroden gegenüberliegenden

30 Wandung - also beispielsweise bei am Innenkörper anliegenden Elektroden die Innenwandung der Außenhülle - so bemessen ist, daß die suspendierten

zellen und, im Falle einer Fusion von Zellen, die Fusionsprodukte den Durchgang zwischen Elektroden und Wandung gerade ohne Schädigung passieren können.

5

Bei Verwendung von Einrichtungen zur Erzeugung eines elektrischen Wechselfeldes (für die Bildung der Zellenreihe) mit einer Ausgangsspannung von 50 V<sub>p-p</sub> an 50Ω und einer Einrichtung zur

10 Erzeugung eines Rechteckpulses (für den elektrischen Durchbruch) von 100 V an 50Ω beträgt der Abstand der Elektroden zueinander je nach der Art und Größe der zu behandelnden Zellen im allgemeinen 20 µm bis 500 µm. Er wird für Hefe und Bakterien-

15 zellen etwa zwischen 50 µm und 100 µm, für tierische Zellen etwa zwischen 100 µm und 200 µm und für pflanzliche Zellen etwa zwischen 100 µm und 500 µm liegen. Die Steigung der mehrgängigen Schraube ergibt sich dabei aus dem gewählten

20 Elektrodenstand. Bei Verwendung einer Einrichtung mit höherer Ausgangsspannung und entsprechend höherer Leistung kann der Elektrodenabstand selbstverständlich größer - beispielsweise 5 mm - sein.

25

Bei größerem Elektrodenabstand und damit auch bei größerem Elektrodenquerschnitt ist von Vorteil, wenn die Elektroden kreisförmigen Querschnitt aufweisen. Das ist beispielsweise dann der Fall,

30 wenn die Elektroden aus einem auf den Innenkörper gewickelten Draht bestehen. Infolge des Kreisquerschnittes bildet sich zwischen den Elektroden

ein im Hinblick auf die Bildung einer Zellenreihe günstiges inhomogenes Feld aus. Dabei ist es zweckmäßig, daß die Elektroden zu etwa einem Drittel ihres Durchmessers in ihrer Auflage 5 versenkt angeordnet sind. Auf diese Weise wird der Raum für die Zellensuspension möglichst klein gehalten.

Bei sehr geringen Elektrodenabständen, bei denen 10 die Elektrodenschraube nicht aus Draht gewickelt werden kann, sondern andere Techniken zur Herstellung der Elektrodenschraube angewendet werden müssen, ergibt sich ein inhomogenes elektrisches Feld dann, wenn die Elektroden als flaches Band 15 an dem Innenkörper oder der Innenwandung der Außenhülle anliegen.

Bei einer Elektrodenlänge von mehr als etwa 1 m sind die Elektroden zweckmäßigerweise jeweils 20 als elektrische Schleife ausgebildet, wobei jedes Ende der Elektroden mit einem Elektroden-anschluß in Verbindung steht. Zur Vermeidung von Reflektionen im Elektrodensystem werden 25 zwei entsprechende - einer Seite der mehrgängigen Schraube zugeordnete - Anschlüsse der Elektroden über einen Widerstand miteinander verbunden, wobei der Widerstand auf den Wellenwiderstand abgeglichen ist. Die übrigen Anschlüsse der Elektroden sind dann mit der oder den Einrichtungen 30 zur Erzeugung des elektrischen Feldes verbunden.

15

- 16 -

Ein Abgleich des Widerstandes ist dabei beispielsweise - bei einer Außenhülle und einem Innenkörper aus Polymethacrylat und Platin als Elektrodenmaterial - bei einem Elektrodenabstand von 200  $\mu\text{m}$  und einer Frequenz der elektrischen Spannung von 1 MHz sowie einer Leitfähigkeit der Suspensionslösung von etwa 0,5 bis 1 mS dann nicht erforderlich, wenn die Elektroden eine Länge von 1,5 m nicht überschreiten.

10

Um die Zellen während des Betriebes der Kammer unter dem Mikroskop beobachten zu können, ist es zweckmäßig, daß die Außenhülle der Kammer aus durchsichtigem Material, beispielsweise Polymethacrylat, besteht und an wenigstens einer Stelle ihres Außenmantels eben ausgebildet ist. Die Außenhülle kann dabei auch beispielsweise als Sechskant ausgebildet sein.

15

Während des Betriebes der Kammer kann es infolge

des Stromflusses zu einer für die Zellen ungünstigen Erwärmung der die Zellen enthaltenden Suspension kommen. Dieser Erwärmung wird bei einer Ausführungsform der Kammer gemäß der Erfindung, 5 bei der durch den Innenkörper eine Kühlleitung geführt ist, entgegengewirkt. Eine Kühlleitung kann aber auch in der Außenhülle angeordnet sein.

10 Die Kammer gemäß der Erfindung kann als Durchflußkammer ausgestaltet sein, beispielsweise dadurch, daß sich an den Stirnseiten der Kammer die Zu- und Ableitungen befinden. Zum Betrieb der Kammer wird dann eine vorbestimmte Menge 15 an Zellsuspensionslösung in die Kammer gedrückt oder gesaugt, die elektrische Behandlung vorgenommen, darauf die in der Kammer befindliche Suspensionslösung aus der Kammer gedrückt oder gesaugt und durch eine neue Menge an Zellsuspension 20 ersetzt.

Zum Durchspülen des Kammerraumes mit einer Reinigungslösung nach der elektrischen Behandlung der Zellen kann es zweckmäßig sein, daß der 25 Innenkörper ein zum Raum der Kammer hin geöffnetes, von außen über eine Leitung zugängliches Poren- system aufweist, über welches eine Flüssigkeit in den Raum gedrückt werden kann, wobei die dem Raum zugewendeten Öffnungen der Poren kleiner 30 als der Durchmesser der zu behandelnden Zellen ist. Während des Betriebs der Kammer ist das Poresystem dann zweckmäßigerweise mit der gleichen Lösung, in welcher die Zellen suspendiert sind,

jedoch ohne Zellen, gefüllt.

Als besonders vorteilhaft hat sich jedoch eine Ausführungsform der Kammer gemäß der Erfindung 5 erwiesen, bei der die Außenhülle der Kammer an einer Stirnseite geschlossen ausgeführt ist, der Innenkörper stabförmig und an die innere Form der Außenhülle angepaßt ausgebildet ist und daß ein Verschluß zum Verschließen des Raumes 10 an der offenen Stirnseite der Außenhülle vorgesehen ist. Durchqueren dabei die Elektrodenanschlüsse nicht den Raum der Kammer, sind die Elektrodenanschlüsse also bei an dem Innenkörper anliegenden Elektroden durch den Innenkörper 15 nach außen geführt, dann kann eine Beladung der Kammer mit Zellsuspension dadurch vorgenommen werden, daß in die Außenhülle, welche zweckmäßigerverweise die Form eines Reagenzglases hat, eine solche Menge an Zellsuspension eingegeben wird, 20 die bei in die Außenhülle eingetauchtem Innenkörper den Kamerraum gerade ausfüllt und daß durch behutsames Eintauchen des stabförmigen Innenkörpers die die Zellen enthaltende Flüssigkeit über den ganzen Raum der Kammer verteilt wird.

25 Zweckmäßig kann es ferner sein, daß die geschlossene Stirnseite der Außenhülle eine Öffnung aufweist. Ist diese verschließbar, dann ist die Möglichkeit gegeben, zunächst wie mit der die Form eines 30 Reagenzglases aufweisenden Außenhülle (die keine untere Öffnung aufweist) zu verfahren, nach der Durchführung der elektrischen Behandlung

jedoch die Zellensuspension durch die Öffnung abzusaugen.

5 Eine weitere vorteilhafte Ausführungsform der Kammer gemäß der Erfindung besteht darin, daß ein an die Außenhülle lösbar anschließbares, mit der Öffnung in der Außenhülle in Verbindung stehendes Zusatzgefäß vorgesehen ist.

10 Zweckmäßigigerweise wird bei verschlossener Öffnung in der Außenhülle der Kammer zunächst die elektrische Behandlung der Zellen vorgenommen, sodann bei offener Öffnung das Zusatzgefäß an der Außenhülle befestigt und danach die Zellen durch 15 Zentrifugieren - wobei die Kammer selbstverständlich von der oder den Einrichtungen zur Erzeugung des elektrischen Feldes abgetrennt ist - durch die Öffnung in das Zusatzgefäß gebracht. Das Zusatzgefäß kann dabei mit einer beliebigen, für die Weiterbehandlung der Zellen geeigneten Lösung, beispielsweise einem Nähr- 20 oder einem Selektionsmedium, gefüllt sein.

25 Bei einer weiteren Ausführungsform der Kammer gemäß der Erfindung ist das Zusatzgefäß auch während der elektrischen Behandlung der Zellen an der Außenhülle der Kammer befestigt. Hierzu ist, wenn sich im Zusatzgefäß eine Lösung befindet, die während des Betriebs der Kammer nicht in 30 den Raum der Kammer gelangen soll, die über die Öffnung in der Außenhülle führende Verbindung zwischen dem Raum der Kammer und dem Innenraum des Zusatzgefäßes zweckmäßigigerweise unterbrechbar.

Das kann beispielsweise durch ein von außen betätigbares Absperrorgan für die Öffnung in der Stirnseite der Außenhülle geschehen.

5 Zur Unterbrechung der über die Öffnung in der Stirnseite der Außenhülle führenden Verbindung zwischen dem Raum der Kammer und dem Innenraum des Zusatzgefäßes kann die Öffnung des Zusatzgefäßes auch mit einer Folie abgedeckt sein.

10 Dabei ist, um die Zellen nach deren elektrischen Behandlung durch Zentrifugieren in das Zusatzgefäß zu bringen, eine von außerhalb der Kammer betätigbare Einrichtung vorgesehen, mittels der die Folie bei an der Außenhülle befestigtem Zusatzgefäß durchlöchert werden kann.

20 Eine solche Einrichtung kann darin bestehen, daß eine bewegbar im Innenkörper geführte Nadel vorgesehen ist, mittels der die Folie durchlöchert werden kann. Eine solche Nadel kann jedoch auch im Zusatzgefäß, und zwar von unten betätigbar angebracht sein.

25 Das Volumen des Innenraums des Zusatzgefäßes wird zweckmäßigerweise so gewählt, daß für die nach der elektrischen Behandlung in das Zusatzgefäß abzentrifugierten Zellen die Zellendichte für das Wachstum hinreichend ist. Im allgemeinen wird das Volumen - das allerdings von der Größe 30 der Kammer abhängig ist - 500 µl bis etwa 2 ml betragen.

Ausführungsbeispiele der Kammer gemäß der Erfindung sind in der Zeichnung schematisch dargestellt

und werden im folgenden näher erläutert:

Es zeigen

5      Figur 1 einen Längsschnitt durch eine als Durchflußkammer ausgebildete Kammer mit am Innenkörper anliegenden Elektroden in Form einer Doppelhelix,

10     Figur 2 einen Längsschnitt durch eine als Durchflußkammer ausgebildete Kammer mit an der Innenwandung der Außenhülle anliegenden Elektroden in Form einer Doppelhelix,

15     Figur 3 Längsschnitt durch eine Kammer mit die Form eines Reagenzglases aufweisender Außenhülle und in die Außenhülle einschiebbarem Innenkörper,

20     Figur 4 Längsschnitt durch eine Kammer gemäß Figur 3 mit an die Außenhülle aufsteckbarem Zusatzgefäß und im Innenkörper bewegbar geführter Nadel zum Durchlöchern der Folie des Zusatzgefäßes,

25     Figur 5 Längsschnitt durch einen Innenkörper gemäß Figur 4 mit Kühlleitung,

Figur 6 Querschnitt durch den Innenkörper gemäß Figur 5 längs der Linie A-B.

Wie aus Figur 1 ersichtlich ist, wird der Raum 1 der Kammer durch einen Innenkörper 2 und eine den Innenkörper um dessen Längsachse umschließende Außenhülle 3 seitlich begrenzt. Innenkörper 2 ist - aus der Zeichnung allerdings nicht ersichtlich - zylindrförmig und die Außenhülle 3 als zylindrförmiger Mantel ausgebildet. Beide Körper

bestehen aus Polymethacrylat oder einem anderen Kunststoff.

Wie aus Figur 1 ferner zu ersehen ist, umgeben 5 die Elektroden 4 und 5, die aus einer Wicklung aus Platindraht bestehen, den Innenkörper 2. Die Elektroden haben auf ihrer ganzen Länge den gleichen Abstand zueinander. Sie sind jeweils als Schleife ausgebildet. Die vier Elektroden- 10 anschlässe 4a, 4b sowie 5a und 5b sind durch den Innenkörper 2 nach außen geführt. Die Anschlüsse 4b und 5b können über einen in der Zeichnung nicht dargestellten, abzugleichenden Widerstand miteinander verbunden werden.

15 Der durch die Elektroden 4 und 5 begrenzte Bereich, in dem die Zellen dem elektrischen Feld ausgesetzt werden, umgibt den Innenkörper 2 als ein in der Form einer Doppelhelix ausgebildeter Teil- 20 bereich 6a und 6b des Raumes 1.

Der Abstand der Elektroden 4 und 5 zu der Innenwandung der Außenhülle 3 ist über die ganze Länge der Kammer konstant und liegt in dem in 25 der Zeichnung dargestellten Beispiel etwa in dem Bereich von 100  $\mu\text{m}$  bis 500  $\mu\text{m}$ .

Die in Figur 1 dargestellte, als Durchflußkammer ausgebildete Kammer ist an den Stirnflächen 30 geschlossen. Zur Zuführung der die Zellen enthaltenden Lösung sind eine verschließbare Zuleitung 7 und eine verschließbare Ableitung 8 vorgesehen.

Bei der in Figur 2 dargestellten, ebenfalls

als Durchflußkammer ausgebildeten Kammer liegen im Unterschied zu der in Figur 1 dargestellten Ausführungsform der Kammer die Elektroden 4 und 5 an der Innenwandung der Außenhülle 3 an.

5

Bei der in Figur 3 dargestellten Ausführungsform der Kammer ist die Außenhülle 3 an einer Stirnseite bis auf eine verschließbare Öffnung 9 verschlossen ausgeführt. Die Außenhülle 3 ist zylindrisch und - bis auf die Öffnung 9 - in der Art eines Reagenzglases ausgebildet. Der Innenkörper 2 ist stabförmig und an die Innenform der Außenhülle 3 angepaßt ausgebildet. An ihm liegen die Elektroden 4 und 5 an, deren Anschlüsse 4a, 4b sowie 5a und 5b durch den Innenkörper 2 nach außen geführt sind. Der durch die Elektroden begrenzte Bereich umgibt, wie bei der in Figur 1 dargestellten Ausführungsform der Kammer, den Innenkörper 2 als in der Form einer Doppelhelix ausgebildeter Teilbereich 6a und 6b des Raumes 1.

10

15

20

25

An der der offenen Stirnseite der Außenhülle 3 entsprechenden Stirnseite des Innenkörpers 2 ist ein Verschluß 10 für die Außenhülle 3 angebracht.

30

Die in Figur 4 dargestellte Ausführungsform der Kammer geht von der in Figur 3 dargestellten Ausführungsform aus, ist jedoch um das Zusatzgefäß 11 ergänzt. Die Außenhülle 3 ist bei der in Figur 4 dargestellten Ausführungsform so ausgebildet, daß das Zusatzgefäß 11 aufsteckbar

ist. Die Öffnung 9 ist nicht verschlossen. Das Zusatzgefäß ist mit einer Folie 12 verschließbar. Es dient dann zur Aufnahme einer Flüssigkeit, beispielsweise eines Nährmediums, das während 5 des Betriebs der Kammer nicht in den Raum 1 gelangen soll. Zum Durchlöchern der Folie nach dem Betrieb der Kammer und um die im Raum 1 befindlichen Zellen in das Zusatzgefäß abzentri- 10 fugieren zu können, ist eine durch den Innenkörper 2 geführte, bewegbare Nadel 13 vorgesehen.

In Figur 5 ist der Innenkörper 2 gemäß der in Figur 4 dargestellten Ausführungsform der Kammer wiedergegeben, jedoch mit einem zusätzlichen 15 Kühlsystem, durch die ein Kühlmedium während des Betriebs der Kammer geleitet werden kann. Das Kühlsystem besteht aus der Zuleitung 14a, dem Hohlraum des Innenkörpers, in den die Zu- leitung 14a hineinragt, und der Ableitung 14b.

20 Figur 6 zeigt einen Querschnitt durch den Innenkörper 2 der Figur 5 längs der Linie A-B.

Nummer:  
Int. Cl. 3:  
Anmeldetag:  
Offenlegungstag:

33 17 415  
C 12 N 13/00  
13. Mai 1983  
15. November 1984

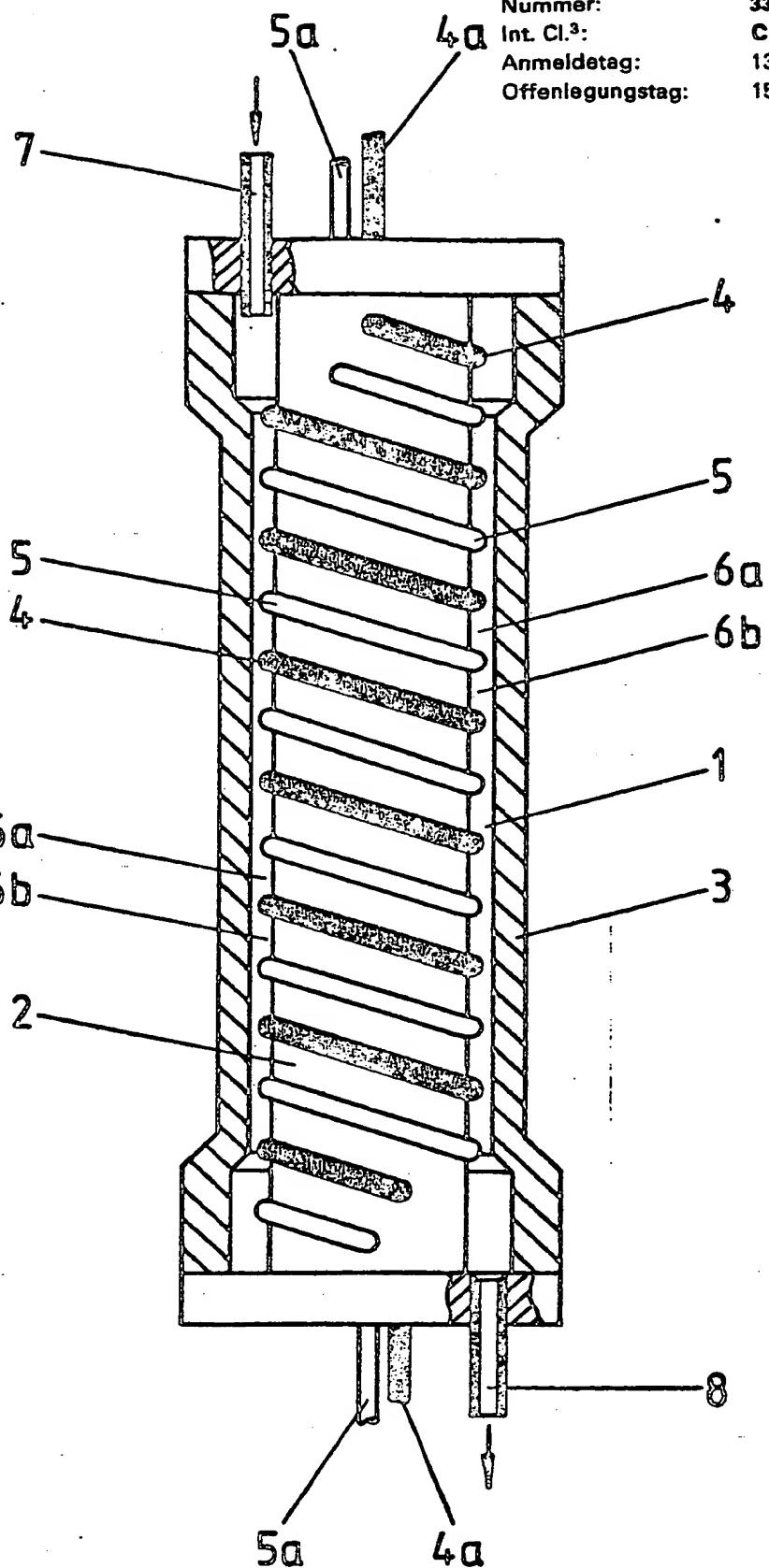


Fig. 1

-24-  
- Leerseite -

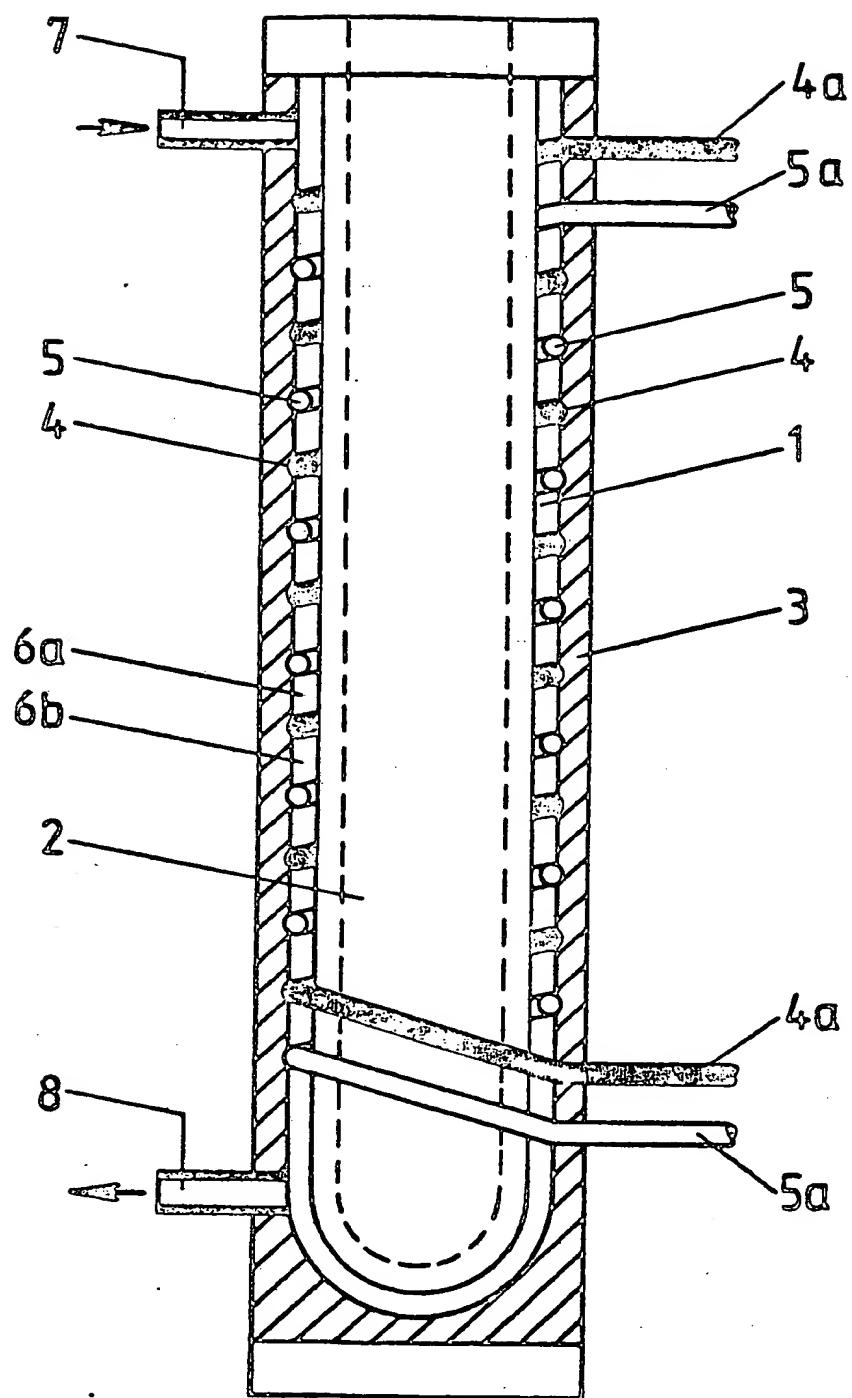


Fig. 2

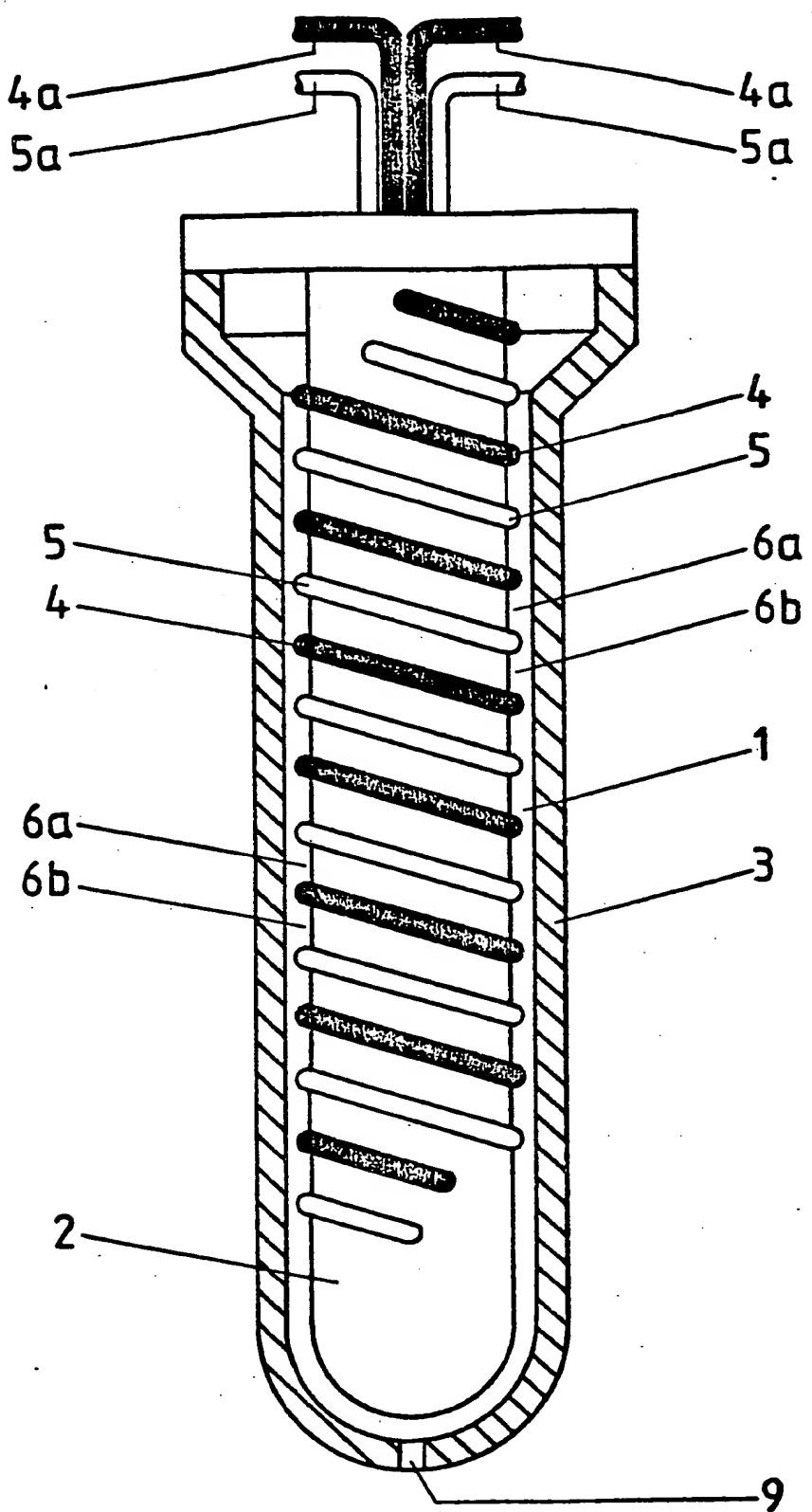


Fig. 3

133317415

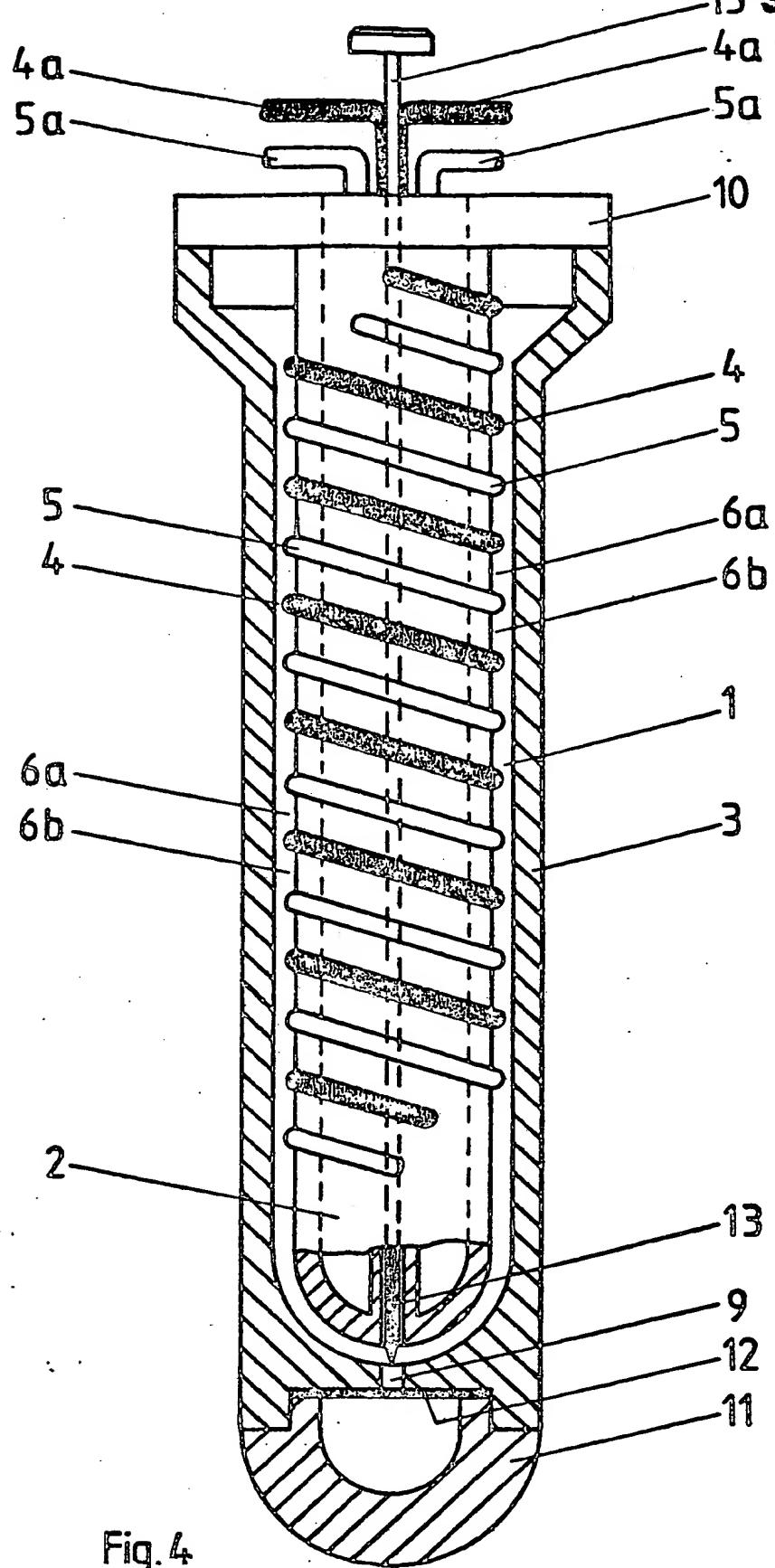


Fig. 4

29.07.83

3317415

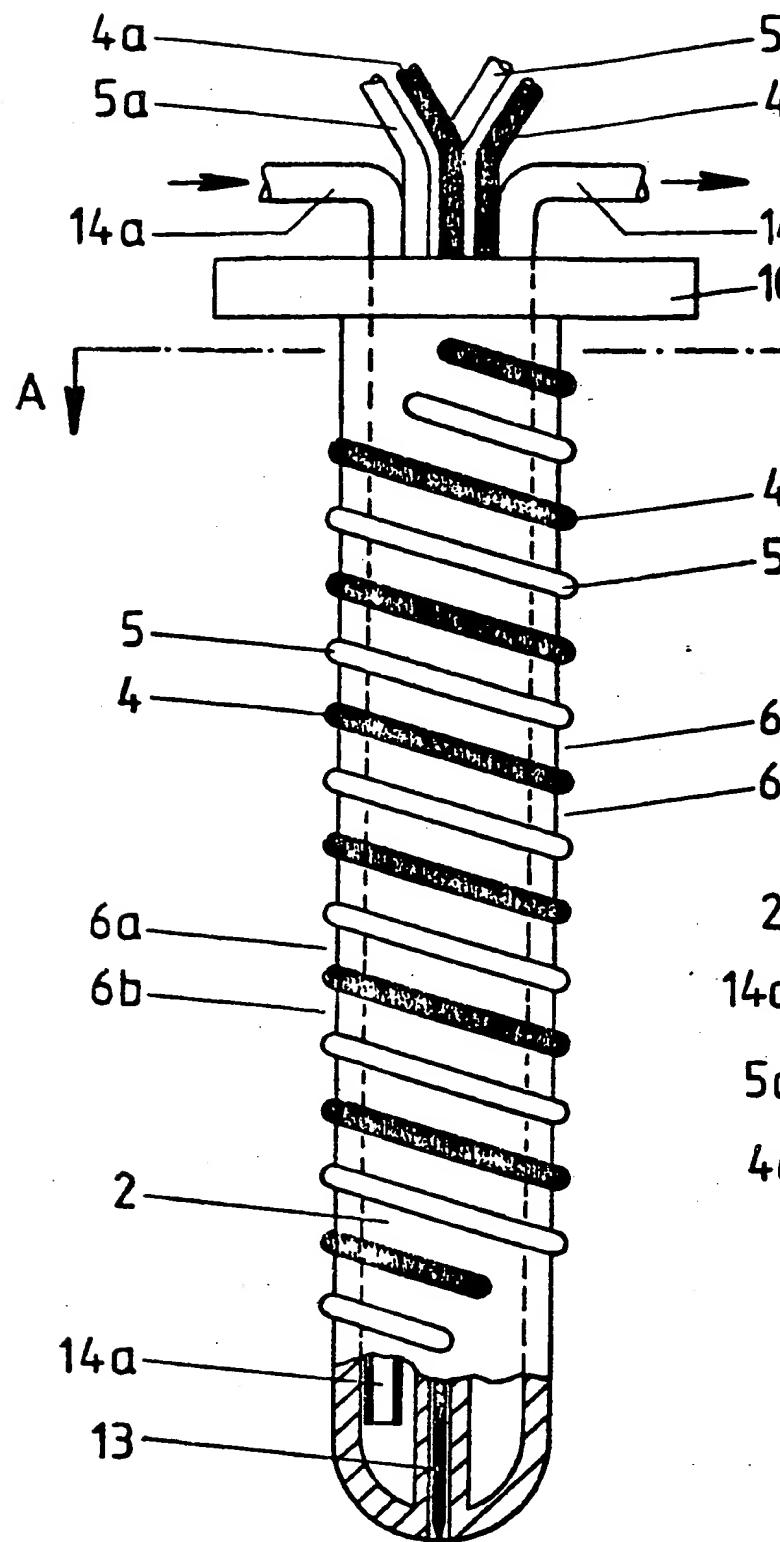


Fig. 5